

THE INFLUENCE OF THE READING CONTEXT UPON
THE SUPPRESSION OF NONSENSE CODONS

(INFLUENCE DU CONTEXTE DE LECTURE SUR LA SUPPRESSION
DE CODONS "NON-SENS")

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade
de docteur ès sciences biologiques

par

Michèle FLÜCK

de

Genève (GE)

Texte condensé de la thèse No 1669 approuvée par la Faculté
des Sciences.

Des copies en microfilms du texte complet peuvent être obte-
nues auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de
Genève.

Le texte complet peut être consulté à cette bibliothèque ou
à la Bibliothèque nationale suisse à Berne.

Thèse No 1669

GENEVE

Imprimerie de la Section de physique

1974

THE INFLUENCE OF THE READING CONTEXT UPON
THE SUPPRESSION OF NONSENSE CODONS

(INFLUENCE DU CONTEXTE DE LECTURE SUR LA SUPPRESSION
DE CODONS "NON-SENS")

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade
de docteur ès sciences biologiques

par

Michèle FLÜCK

de

Genève (GE)

Texte condensé de la thèse No 1669 approuvée par la Faculté des Sciences.

Des copies en microfilms du texte complet peuvent être obtenues auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de Genève.

Le texte complet peut être consulté à cette bibliothèque ou à la Bibliothèque nationale suisse à Berne.

Thèse No 1669

GENEVE

Imprimerie de la Section de physique

1974

La faculté des sciences, sur le préavis du professeur R.H. EPSTEIN, Département de Biologie Moléculaire, directeur de thèse, et d'une commission composée de Messieurs L. CARO (Faculté des Sciences - Genève) et J.D. GROSS (MRC Department of Molecular Biology, Edinburgh, Scotland), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 11 juillet 1974

Le Doyen :

Thèse no 1669

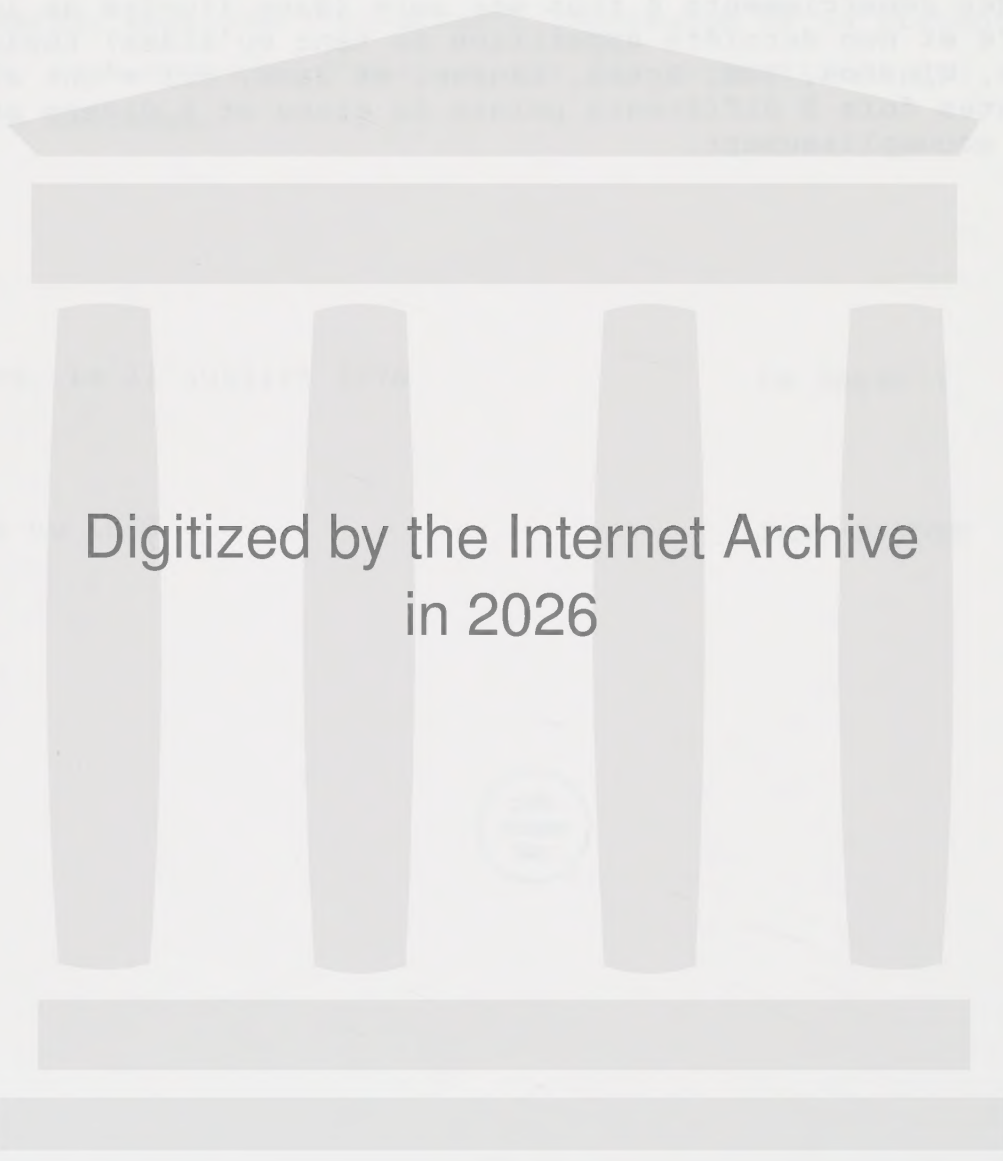
Jean MULLER



Remerciements

Ma reconnaissance à Dick Epstein, dont l'enthousiasme pour la science et la confiance patiente en moi m'ont aidée à trouver ma voie en biologie.

Mes remerciements à tous mes amis (dans l'ordre de leur première et non dernière apparition en tant qu'aides) Lucien, Fred, Dave, Winston, Tom, Bruce, Lauren, et Jack, qui m'ont aidée maintes fois à différents points du globe et à divers stades de cet accomplissement.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Parmi les 64 triplets du code génétique, trois - appelés codons non-sens - ne semblent pas avoir de rôle dans le processus d'allongement de la chaîne polypeptidique. Ce sont les codons UAG (dits codon ambre), UAA (codon ochre) et UGA (codon opale)*. La création, par mutagenèse, de tels codons dans le message génétique résulte en un arrêt de la traduction au site de la mutation. Lorsqu'un gène porte une mutation de ce type (mutation non-sens), un fragment de chaîne protéique est produit au lieu d'une protéine complète. Il était naturel de penser que l'un au moins des codons non-sens est utilisé dans le signal normal de terminaison des chaînes polypeptidiques.

L'effet terminateur des mutations non-sens peut être supprimé, soit génétiquement, soit phénotypiquement. Diverses souches bactériennes portent, par exemple, des supprimeurs génétiques pour telle ou telle mutation non-sens. De telles souches, variants naturels, définissent la létalité conditionnelle d'une mutation non-sens et ont permis l'isolement de mutants de ce type. D'autre part, une suppression phénotypique efficace peut être obtenue par l'action de substances telles que la streptomycine et le 5-fluorouracile. Quelle qu'en soit la cause, la suppression se fait toujours par l'insertion d'un acide aminé au point de la chaîne polypeptidique correspondant au site de la mutation. Une telle insertion permet une reprise de la propagation de la chaîne au-delà de ce point. Dans un tel système, il doit exister une compétition entre les réactions de terminaison et celles de propagation : le taux relatif de ces deux réactions affectera l'efficacité de la suppression.

* U = uracile, A = Adénine, G = Guanine

Cette thèse présente les résultats d'une étude sur l'efficacité de la suppression obtenue pour des mutations non-sens situées à des sites divers et une interprétation des variations observées dans cette efficacité, interprétation qui résulte en la formulation d'un modèle sur le signal codant la terminaison naturelle des protéines.

Nous avons utilisé le bactériophage T4 pour cette étude et avons examiné, en particulier, des mutations situées dans le segment B1 du cistron rIIB. La région correspondante de la protéine, définie par une délétion, semble être non essentielle; en effet, son absence totale ou partielle ou son remplacement par une région de séquence quelconque ne semblent pas altérer la fonction du cistron rIIB, du moins telle qu'elle est définie par nos expériences. Par conséquent, il est improbable que l'acide aminé inséré lors de la suppression d'une mutation non-sens dans cette région puisse rendre la protéine moins fonctionnelle que dans son état sauvage. Nous croyons donc que lors de la suppression de tous les mutants non-sens du segment B1, le niveau d'activité de la protéine rIIB reflète directement la concentration de cette protéine, c'est-à-dire le degré de suppression.

Dans les bactéries lysogènes pour le phage lambda, le développement des phages T4 (donc le rendement d'une infection) nécessite l'expression de la fonction rIIB. Lors d'une infection d'une telle souche avec des mutants non-sens de rIIB, en présence d'un suppresseur, le rendement de T4 reflète le degré de suppression de la mutation; nous avons donc utilisé ce rendement comme une mesure de la suppression. Le rendement maximum est donné par le type sauvage (rendement = 1.0, par définition) et le minimum par le rendement de mutants rIIB non suppressibles, par exemple une délétion (rendement = 10^{-3} à 10^{-4}). Pour obtenir une estimation plus directe de l'efficacité de suppression, nous avons essayé de déterminer les variations du rendement en fonction de variations dans la concentration en protéine rIIB. Dans ce but, nous avons infecté des cellules avec une population de phages de deux types, des producteurs et des non-producteurs de protéine rIIB, dans un rapport

connu. Si l'on suppose que la concentration en protéine rIIB est directement proportionnelle à la fréquence des allèles producteurs dans la population, ces expériences permettent d'établir le rendement phagique en fonction du niveau relatif de protéine rIIB.

Nous avons analysé pour plusieurs supresseurs le rendement de mutants non-sens situés à 12 sites de la région B1 et représentés par l'un ou plusieurs de leurs allèles (ambre, ochre ou opale), soit un total de 22 mutants. Avec chaque supresseur, nous avons mesuré pour chaque mutant le rendement d'un cycle d'infection à basse multiplicité, comparant entre elles les valeurs obtenues avec et sans supresseur, et normalisant le rendement par rapport à celui du type sauvage. La valeur d'efficacité de suppression ainsi définie varie entre 1.0 et environ 10^{-3} .

Comme supresseurs, nous avons utilisé le 5-fluoro-uracile, la streptomycine et les supresseurs génétiques; nous avons aussi examiné la suppression spontanée (c'est-à-dire la suppression faible observée dans une souche qui ne porte pas de supresseur génétique identifiable). Ces divers agents ont des modes d'action différents. Le 5-fluoro-uracile s'incorpore à la place de l'uracile dans le messager. Une des formes tautomériques probables du 5-fluoro-uracile peut être alors reconnue comme cytosine; ainsi, une tautomérisation concomitante à la traduction d'un codon non-sens peut résulter en sa suppression. La streptomycine, par une interaction de nature inconnue avec le ribosome, induit des erreurs de lecture; la suppression a lieu lorsqu'une erreur est commise dans la lecture d'un codon non-sens. Les supresseurs génétiques utilisés possèdent des ARN de transfert, mutants dans leur anticodon, qui peuvent s'apparier à un codon non-sens. Le mécanisme de la suppression spontanée n'est pas connu.

L'étude de la suppression par ces différents mécanismes a donné les résultats suivants :

- 1) Pour chaque supresseur, l'efficacité de suppression (mesures en rendement, normalisées par rapport à celui du type sauvage) varie énormément pour des mutants à des sites différents. Cer-

tains mutants sont très bien supprimés (rendement proche de 1.0), d'autres très peu (rendement proche de 10^{-3}); des valeurs intermédiaires sont aussi observées. Ces variations existent pour les mutations ambres aussi bien que pour les mutations ochres. De plus, nous avons démontré qu'elles ne sont particulières ni à cette région de la protéine rIIB, ni à ce gène.

- 2) Avec tous les supprimeurs et pour tous les sites étudiés un mutant ambre est plus facilement supprimé que le mutant ochre au même site; cette différence entre allèles peut être très forte (Maximum observé : 500 fois).
- 3) Les variations dans l'efficacité de suppression à différents sites ont été observées par une mesure indirecte de la suppression : le rendement phagique. L'ordre de grandeur de ces variations est d'au moins 1000 fois. Dans des expériences de reconstruction, nous avons déterminé que le rendement (tel que nous l'avons mesuré) varie quadratiquement avec la concentration de protéine rIIB; les variations observées dans le rendement correspondent donc à des variations d'au moins 30 fois dans la concentration de la protéine rIIB produite par la suppression à différents sites, soit à des variations de 30 fois au moins dans l'efficacité de la suppression.
- 4) La comparaison de l'efficacité de suppression obtenue avec différents supprimeurs pour des mutations au même site montre un parallélisme. Les mutants facilement supprimables par un type de supprimeur le sont aussi par un autre; de même, les mutants pauvrement supprimés le sont par tous les supprimeurs. Le cas le mieux documenté concerne les suppressions par le 5-fluoro-uracile et par la streptomycine. Dans ce cas, nous avons calculé le coefficient de corrélation pour la série de mutants étudiés entre les efficacités de suppression par ces deux mécanismes. La corrélation est élevée (0.78) et la probabilité qu'un tel résultat soit obtenu par hasard est basse (0.1%). Une corrélation positive est aussi observée entre la suppression génétique et celle par le 5-fluoro-uracile. Les variations obtenues

pour la suppression spontanée suivent le même mode que celles obtenues pour les autres supprimeurs.

Nous avons tiré les conclusions suivantes de cette série de résultats :

- 1) Puisque les supprimeurs que nous avons utilisés ont des modes d'actions totalement différents, les variations observées dans l'efficacité de suppression de mutants à différents sites doivent provenir de la variation, selon le site, du taux d'une réaction commune à tous les mécanismes de suppression.
- 2) Vu l'ampleur des variations dans l'efficacité de suppression, le facteur principal déterminant la suppressibilité d'une mutation non-sens par tout supprimeur semble être la séquence de nucléotides voisins de la mutation (c'est-à-dire son "contexte").

Quelle que soit la raison de l'influence du contexte sur la suppression d'une mutation non-sens, ce résultat implique que certaines modifications du contexte d'une mutation non-sens doivent résulter en une altération de la suppressibilité de cette mutation. Cette prédiction a été vérifiée comme suit : partant d'un mutant non-sens mal supprimé, nous avons établi un système de sélection pour une mutation secondaire rendant ce mutant plus facilement suppressible. Nous avons obtenu, en un seul pas, une mutation secondaire qui augmente le degré de suppression de ce mutant par un facteur de 10 environ. Un accroissement d'environ 100 a été mesuré pour le rendement, suggérant une augmentation par un facteur de 10 de la concentration de protéine rIIB. L'accroissement dans l'efficacité de la suppression a été démontré pour tous les supprimeurs génétiques, le 5-fluoro-uracile, la streptomycine et la suppression spontanée. De plus, cette mutation secondaire montre son effet aussi bien sur l'allèle ambre que sur l'allèle ochre du mutant. Finalement, nous avons démontré que cette mutation se trouve très proche de la mutation originale, probablement en aval de la mutation non-sens et qu'elle n'est pas une mutation de redémarrage de la synthèse polypeptidique. L'existence de ces mutations secondaires (mutations de contexte) démontre la validité de notre conclusion, à savoir que le

contexte dans lequel se trouve une mutation non-sens joue un rôle primordial dans la détermination de l'efficacité de suppression.

Comme nous l'avons discuté dans la présentation de cette étude, deux réactions sont en compétition au site d'une mutation non-sens, en présence d'un supprimeur : terminaison et propagation de la chaîne polypeptidique. La structure de la molécule autour d'une mutation non-sens pourrait influencer le taux de l'une aussi bien que de l'autre de ces réactions. A présent, il n'existe pas d'évidence indiquant laquelle des deux réactions est la plus affectée par la séquence des nucléotides voisins d'un triplet. Nous ne pouvons donc que spéculer. Vu l'amplitude et la fréquence des variations observées, nous avons choisi de proposer le modèle suivant :

Le signal déterminant normalement la terminaison d'une chaîne polypeptidique consiste en un triplet non-sens suivi de quelques autres bases. La reconnaissance de ce signal assure la terminaison de la chaîne polypeptidique et un décrochage rapide du ribosome. Lorsqu'une mutation non-sens apparaît à l'intérieur du message, il est probable que le signal ainsi créé est incomplet en tant que signal de terminaison. Le ribosome s'arrête, à cause du codon non-sens, mais le relâchement de la chaîne polypeptidique est lent. Le ribosome reste longtemps en position de lecture et permet à la suppression d'avoir lieu. Le degré de ressemblance du signal naturel au signal créé par mutation varie de site en site selon le contexte, déterminant un taux variable de décrochage de la chaîne polypeptidique. De là viendraient les variations observées dans l'efficacité de suppression selon le site. On trouve dans la littérature un certain nombre d'évidences soutenant plusieurs aspects de ce modèle.

